

90: 148152c. **Metabolic products of microorganisms.** 177. Avilamycin C. Heilman, William; Kupfer, Ernst; Keller, Schierlen, Walter; Zaechner, Hans; Wolf, Heinz; Peter, Heinrich H. (Org. Chem. Lab., Eidg. Tech. Hochschule, Zurich, Switz.). *Helv. Chim. Acta* 1979, 62(1), 1-6 (Ger). Culture filtrates of *Streptomyces viridichromogenes* E TH23575, previously shown to contain the incompletely characterized antibiotic avilamycin, also contained a related compd. with weaker antibacterial action. IR, UV,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and chem. tests showed the earlier compd., now designated avilamycin A, to be a Me ketone, and the new compd., avilamycin C, to be the corresponding Me carbinol.

90: 148153f Preliminary studies on the isolation of coronavirus 229E nucleocapsids. Saul, E. O.; Ashley, C. R.; Ferguson, Morag; Egglestone, S. I. (Public Health Lab., Bristol, Engl.). *FEMS Microbiol. Lett.* 1979, 5(2), 101-5 (Eng). A procedure was devised for purifn. of coronavirus 229E nucleocapsids by rate zonal and isopycnic centrifugation and Nonidet-P40 (I) detergent treatment. The virus had a d. in sucrose of 1.18 g/mL. The nucleocapsid-like structures released by I treatment of intact purified virus superficially resembled paramyxovirus nucleocapsids by electron microscopy, but were smaller in diam., and the appearance of the subunit structure differed from the classical herringbone appearance of paramyxovirus nucleocapsids. These nucleocapsid-like structures had a d. of 1.27 g/mL in sucrose, which is within the range of reported densities for the nucleocapsids of other large RNA viruses (Bukrinskaya, A. G., 1973).

90: 148154g Effect of temperature, growth rate, and nutrient limitation on the yield and composition of three bacterial isolates from an arctic soil grown in continuous culture. Nelson, Louise M. (Dep. Biol., Univ. Calgary, Calgary, Alberta). *Can. J. Microbiol.* 1978, 24(12), 1452-9 (Eng). Three bacterial isolates from an arctic meadow soil, *Pseudomonas* M216, *Bacillus* M153, and *Arthrobacter* M51, were grown continuously in C- and N-limiting media at 15° and 5° at 3 diln. rates of 0.04-0.01 h<sup>-1</sup>. Measurements of yield, viability, endogenous O uptake rate, and cell compn. indicated that, in general, these isolates were well adapted for growth at low rates and low temp. under nutrient limitation. Changes in cell compn. with temp., growth rate, and nutrient limitation followed patterns similar to those obsd. in organisms studied in other labs. Yields were higher at 15° than at 5° in *Pseudomonas* M216 and *Arthrobacter* M51, and the endogenous respiration rate tended to decrease with decreasing diln. rate. Substrate affinity ( $K_s$ ) and  $\mu_{max}$  (max. growth rate) varied with temp., and *Pseudomonas* M216 exhibited the lowest  $K_s$  for C and N and highest  $\mu_{max}$  under the growth conditions studied, except at 15° under C limitation where *Arthrobacter* M51 exhibited the lowest  $K_s$ . Only *Bacillus* M153 exhibited a significant loss in viability at low diln. rates and a detectable specific maintenance rate (0.0077 h<sup>-1</sup>), factors which may contribute to the low isolation frequency of the genus at the meadow site.

90: 148155h Synthesis of 5-hydroxymethyldeoxyuridine triphosphate in extracts of SP10c phage-infected *Bacillus subtilis* W23. Witmer, Heman; Dosmar, Michael (Dep. Biol. Sci., Univ. Illinois, Chicago, Ill.). *Curr. Microbiol.* 1978, 1(5), 289-92 (Eng). A hypermodified nucleotide partially replaced deoxythymidylate in mature DNA of *Bacillus subtilis* phage SP10c. Studies with crude exts. of SP10c-infected cells revealed that deoxythymidylate synthetase activity declined by 70% during the program and was replaced by deoxyuridylate hydroxymethyltransferase. Exts. of infected cells were able to phosphorylate 5-hydroxymethyldeoxyuridylate to the corresponding triphosphate, but these same exts. could not phosphorylate the hypermodified deoxynucleoside monophosphate. It is suggested that deoxythymidylate and the hypermodified nucleotide in mature SP10c DNA are derived by postreplicational modification of 5-hydroxymethyldeoxyuridylate in newly replicated DNA.

90: 148156j) Elastolytic and caseinolytic activity of micro-organisms (Part 1. Bacteria). Pakarskyte, K.; Ciurlys, T.; Cipijauskiene, P. (Inst. Biokhim., Vilnius, USSR). *Liet. TSR Mokslų Akad. Darb., Ser. C* 1979, (1), 123-31 (Russ). A total of 39 bacterial strains, belonging to *Pseudomonas* and *Bacillus* species, produced extracellular protease upon cultivation in a synthetic mineral medium contg. 5% starch. Among 19 *Pseudomonas* strains high elastase activity was found with *P. pyocyanea* B 1 and B-6 whereas *P. pyocyanea* B<sub>6</sub> and *P. fluorescens* 561 had high caseinase activity. Among 20 *Bacillus* strains, high elastase activity was detected in *B. mesentericus* 40 1 and 159 55 whereas high caseinase activity was found with *B. mesentericus* 40-1 and *B. subtilis* 103.

90: 148157k The lipid composition and its alteration during the growth stage in pathogenic fungus, *Epidermophyton floccosum*. Yamada, Tomiyasu, Watanabe, Ryuji, Nozawa, Yoshinori, Ito, Yuki (Sch. Med., Gifu Univ., Gifu, Japan). *Shunkin to Shinkinsho* 1978, 19(3), 229-37 (Japan). Qual. and quant. changes of lipid compn. during the growth stages were studied in *E. floccosum*. The acyl group compns. of total lipid of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum cookei* were also examd.: The lipids of *E. floccosum* amounted to ~4% of the dr. cell wt. Neutral lipids mainly consisted of triglycerides and sterols, and major polar lipids were phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and an unknown lipid X. The fatty acids in triglycerides and phospholipids were palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, and linoleic acids. The unknown polar lipid X which appeared between phosphatidylethanolamine and cardiolipin on thin layer chromatog. plates contained no P. The acyl compn. of this lipid X was markedly different from those of triglycerides, phosphatidylcholine, and phosphatidylethanolamine. There was no significant change in the fatty acid compn. of *E. floccosum* and *T. rubrum* during the cell growth, whereas profound changes occurred in *M. cookei*. The sterol compn. of *E. floccosum* showed striking, qual. and quant. changes depending on the growth stage.

90: 148158m Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Merson, Michael H.; Oerskov, Frits; Oerskov, Ida; Sack, R. Bradley; Huq, Imdadul; Koster, Frederick T. (Dep. Med., Johns Hopkins Univ., Baltimore, Md.). *Infect. Immun.* 1979, 23(2), 325-9. (Eng). The relation between serotype and enterotoxin prodn. in 109 enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from patients with severe cholera-like diarrhea in Dacca, Bangladesh were examd. Of 69 strains producing both heat-labile and heat-stable toxins, 59 (86%) belonged to 1 of 4 O serogroups, and 56 (81%) of these strains belonged to 1 of 6 O:K:H serotypes. In contrast, 34 strains producing only heat-stable toxin were distributed among 15 O serogroups, and 6 strains producing only heat-labile toxin were distributed among 6 O serogroups. Twelve strains producing heat-labile and heat-stable toxins and 5 strains producing heat-stable toxin had the same serotype (O78:K:H12) and biotype. Apparently, in  $\geq 1$  geog. setting, *E. coli* strains producing both heat-labile and heat-stable toxins are more restricted in their O groups and O:K:H serotypes than *E. coli* that produce only heat-stable toxin and certain serobiotypes may commonly include strains which produce both toxin types.

90: 148159n Cell envelope of *Neisseria gonorrhoeae* CS7: peptidoglycan-protein complex. Hebel, Bruce H.; Wong, William; Morse, Stephen A.; Young, Frank E. (Med. Cent. Univ. Rochester, Rochester, N. Y.). *Infect. Immun.* 1979, 23(2), 353-9 (Eng). Treatment of exponential-phase cells with 4% Na dodecyl sulfate for 3 h at 100° solubilized all cellular components except peptidoglycan. In most strains, cells cultured in liq. gonococcal broth at pH 7.2 yielded a peptidoglycan composed primarily of *N*-acetyluramic acid, *N*-acetylglucosamine, alanine, glutamic acid, and diaminopimelic acid in a molar ratio of 1:1:2:1:1. The peptidoglycan in these cells accounted for 1-2% (dry wt.) of the cells. However, in cells cultured at pH 6.0, the dry wt. of peptidoglycan increased to 4-13%. The apparent increase in wt. appears strain dependent and due in part to assoc. protein(s). *N. gonorrhoeae* strain CS7 had elevated amts. of protein assoc. with the peptidoglycan regardless of growth pH. The peptidoglycan-protein complex was not dissociated by addnl. extn. with Na dodecyl sulfate, 10M LiCl, or EDTA, or by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis. The complex was degraded by lysozyme, trypsin, chymotrypsin, Pronase B, and *Chalaropsis* muramidase.

90: 148160f Production of staphylococcal L-asparaginase in a chemically defined medium. Mikucki, J.; Szarapinska-Kwaszewska, J. (Dep. Pharm. Microbiol., Acad. Med., Lodz, Pol.). *FEMS Microbiol. Lett.* 1979, 5(3), 147-50 (Eng). When *Staphylococcus aureus* NCTC 4135 was grown in a defined medium with 18 amino acids, L-asparaginase (I) formation reached a peak between the end of the lag phase and the beginning of the exponential phase and decreased on further incubation. When arginine, glycine, leucine, methionine, proline, threonine, or valine was deleted from the medium, no growth was detected. When medium 7AA contg. these essential amino acids was supplemented with various other amino acids, some amino acids caused a decrease in I activity. However, supplementation with alanine and serine resulted in a >2-fold increase of I activity. Addn. of alanine alone elicited a similar increase, whereas addn. of serine alone enhanced the I activity >3-fold although relatively little growth was obtained with medium 7AA plus serine.

90: 148161g **Xylanase production by ultraviolet induced variants of *Streptomyces fradiae* SCF-5.** Harish, Vijaya; Joseph, Richard (Discipline microbiol., Ferment., Sanit., Cent. Food Technol. Res. Inst., Mysore, India). *J. Food Sci. Technol.* 1978, 15(6), 243-6 (Eng). When *S. fradiae* SCF-5, a potent glucose isomerase (I) producer in the presence of xylose, was

treated with UV  
xylanase (11) at  
contg. 0.02% xyl.  
that the variant  
variants were gr  
bran or paddy st  
little or no cell  
capable of form  
formed by the  
sufficient xylem  
of L.

90: 148162h S.  
in *Streptomyces*  
wheat bran. 1  
microbiol., Farm  
Mysore, India  
(Eng). Wheat  
xylanase, prom  
at levels comp  
bran hydrolyza  
fractions whic  
contained an

90: 148163j) *N*  
*Bacillus thuringiensis*  
*Tezisy Konf. M.*  
*Lit. SSR. 2nd*  
*Nauk Litovsk*

A partially purified preparation showed low total phospholipid storage and weak lecithinase activity. The effects of various preparations on lecithinase activity in the prepn. are not shown. Thin-layer chromatography

90: 148164k  
from lactic

Terence Davis  
North, N. Z.  
(Eng). Eight  
*S. lactis* grown  
when cells were  
examined. *S. lactis*

The rate of (0–34°) and pH 34° and pH 34° and pH 34° suppressed by temp. to 0°. activity release 90%, resp. in proteinase release.

90: 148165m  
and polygalacturonate  
isolated from

A. H. (Dep. M.  
Bacteriol. 192  
Sitka spruce i

aerobic flora (1 or 2 sp.)  
increase in the permeability

cloacae (NCP)  
extracellular  
intracellular

II were grown  
then replaced  
the medium c

Reduced O<sub>2</sub> consumption and activities. I<sub>max</sub> and when tap

did not occur in the artificial systems, but only in the presence of bacteria. or

and thus the  
90: 148166n  
punctata. N

III.). J. App.  
L-serine deb  
punctata NR

Addn. of 25  
≥10-fold, inc.  
toxic to the o

but DL-serine  
from the L en  
the toxic ef

DL-Serine at

twice that of

原 著

## 病原性真菌 *Epidermophyton floccosum* の 脂質構成とその発育による変動

山田 富保 渡辺 隆司 野沢 義則 伊藤 友喜

岐阜大学医学部生化学教室

〔受付：10月19日，1977年〕

病原性真菌 *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* および *Microsporum cookei* の3種の脂肪酸分析の結果，パルミチン酸 ( $C_{16:0}$ )，パルミトオレイン酸 ( $C_{18:1}$ )，ステアリン酸 ( $C_{18:0}$ )，オレイン酸 ( $C_{18:1}$ )，リノール酸 ( $C_{18:2}$ ) が主なものであり，なかでもリノール酸の含量が著しく多い。また，発育に伴う脂肪酸構成の変化に関して，*M. cookei* は他の2種とはかなり異なつた挙動を示した。*E. floccosum* の発育と脂肪酸，リン脂質およびステロール成分の構成変動を検討した結果，発育に伴つてエルゴステロールの減少とエルゴスタジエノール（+ラノステロール）の増加が示された。また，脂肪酸では *T. rubrum* の場合と似た変化を示し，*M. cookei* とは著しく異なっている。

真菌細胞の脂質分析は，1958年に Cochlane<sup>1)</sup> によつて *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Neurospora* などについてなされており，グリセリド，ステロール，リン脂質などが含まれていることが報告されたが，皮膚糸状菌についての脂質分析はほとんどなされていなかった。1961年に至つて，Audette ら<sup>2)</sup> によつて *Trichophyton mentagrophytes* の総脂肪酸組成とステロール成分の定性分析の結果が報告された。すなわち，パルミチン酸 ( $C_{16:0}$ )，オレイン酸 ( $C_{18:1}^{19}$ )，リノール酸 ( $C_{18:2}^{19,12}$ ) とステアリン酸 ( $C_{18:0}$ ) などの存在が明らかにされ，これらの脂肪酸は全体の90%以上を占めていることも示された。また，ステロールについてはエルゴステロール(ergosterol)が同定された。その翌年に Blank ら<sup>3)</sup> は各種の糸状菌についてステロール物質の分析を行い，ステロール成分から3つのグループに大別した。すなわち，i) エルゴステロールのみを含むもの，ii) ブラシカステロール(brassicasterol)のみを含むもの，および，iii) この両

ステロールを含むグループなどである。また，1962年 Al-Doory ら<sup>4)</sup> は病原性真菌の脂質について定量を行つており *Histoplasma* 属，*Blastomyces* 属の真菌と皮膚糸状菌である *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* などについて全脂質を分別し，リン脂質とアセトン可溶分画の各々を定量した。すなわち，これらの二形性真菌のリン脂質とアセトン可溶脂質はほぼ同量であつたが，皮膚糸状菌においてはアセトン可溶脂質分画がリン脂質の約3倍であることが示された。1964年に Wirth ら<sup>5)</sup> は *T. rubrum* の脂肪酸組成を報告しそれが，*T. mentagrophytes* についての Audette らの報告<sup>2)</sup> とは著しい相違はなく，炭素鎖16と18の脂肪酸からなつており，オレイン酸に比してリノール酸(52.4%)がきわめて多いことが注目された。その後，1969年に Ghoshal<sup>6)</sup> はヒトより単離された *T. rubrum* を培養し，その菌体から抽出した総脂質についてリン脂質分析を行い，ホスファチジルコリン，スフィン

ゴミエリン、リゾリン脂質などの存在を確かめた。1971年には、Domer ら<sup>7)</sup>によつて二形性真菌の *Histoplasma* 属と *Blastomyces* 属の脂質が報告され、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、および中性脂質のトリグリセリドをデンスイトメトリーによつて定量を試みているが、エルゴステロールの定量分析はなされていない。ところで、脂肪酸としては、オレイン酸とリノール酸を主成分として含有するが、yeast phase にはオレイン酸が多く mycelial phase ではリノール酸が増加することが示された。細胞壁成分にはオレイン酸が多くリノール酸は少ないことが示された。1974年に至り、Kish ら<sup>8)</sup>は、*Arthroderma uncatum* のリン脂質について報告している。すなわち、野生株においては、ホスファチジルコリンが最も多く、黒色色素産生能を欠く変異株ではホスファチジルエタノールアミンがホスファチジルコリンとほぼ同じ程度に含まれていることが明らかにされた。さらに、その他のホスファチジルセリン、ホスファチジイノシトールなども量的には少ないが検出されている。また、各々のリン脂質のアシル鎖が分析され、いずれの場合にもリノール酸が主成分であることが示された。さらに、時を同じくして Das ら<sup>9)</sup>は、*T. rubrum* のリン脂質構成についてかなり詳しく報告している。すなわち、培養日数によつて総リン脂質含量とリン脂質組成の変化が見られ、ホスファチジルセリンが最も多いとされており、Ghoshal ら<sup>9)</sup>の分析結果とは一致を見ないが、培養温度の違いに起因していることも考えられる。

この様に、皮膚糸状菌の脂質に関する報告はかなり限られており、しかも定量的な分析は2, 3の報告に見られるにすぎない。そこで、著者らは *Epidermophyton floccosum* の脂質の詳細な分析および発育との関連性について実験を行つた。本菌は、われわれの教室で<sup>10)</sup>ここ数年にわたり、細胞壁の構築構造およびポリエン抗生物質の作用機序に関する研究のモデル細胞として用いられてきており、詳細な脂質分析は新たに有意義な知見を提供するものと考えられる。

#### 実験材料と方法

*Epidermophyton floccosum* (TEF-30), *Trichophyton rubrum* (患者由来), *Microsporum cookei* (HUT-2061) の3種の株を用いて0.5%イーストエキス添加サブロー培地(4%グルコース, 1%ポリペプトン, 0.5%イーストエキス)に、4%グルコースサブロー寒天培地に一週間培養の菌体を白金耳によつて接種して27°Cにおいて振盪培養を行つた。菌体を2日おきに2週間にわたつて採

取し、同時に培地の pH を測定した。採取した菌体を蒸留水でよく洗浄した後に速やかに凍結乾燥した。乾菌体の重量を測定し、ついで脂質の抽出を行つた。すなわち、Folch の方法<sup>11)</sup>に従つてクロロホルム-メタノール(2:1, v/v) 中で室温下で24時間抽出を行いつて1/4~1/5容量の蒸留水を加えてよく攪拌した。放置後二層に分れた下層のクロロホルム層を取り、濃縮してそれを総脂質画分として-20°Cで保存した。また、リン脂質含量の測定<sup>12)</sup>は、脂質抽出液の適当量を試験管に入り、蒸発乾固した後に70%過塩素酸を0.5ml 加え1時間加熱(220°C)することによつて、すべての有機リンを無機リンに変えた。冷却後、蒸留水を1ml 加え、さらに0.4%モリブデン酸アンモニウム液4ml と10%アスコビン酸0.5ml を加えてよく攪拌し、沸騰水浴中にて5分間加熱し発色させた。直ちに流水にて冷却し、リンモリブデン酸に由来する青色溶液を730nm にて比色した。つぎに、ステロール化合物の抽出は Zurkowski の方法<sup>13)</sup>に準じて行つた。まず、脂質抽出液の1ml をアンプル管に入れ蒸発乾固させた後、2N-KOH 50%エタノール水溶液2~3ml を加え封入し、沸騰水浴中にて90分間加熱ケン化した。冷却後アンプル管内溶液を試験管に移してから、 $\alpha$ -ヘキサン5~6ml によつてステロール化合物を抽出し、ついで2回水洗いした後に  $\alpha$ -ヘキサンを留去し、酢酸2ml を加えてステロール化合物を溶解させた。なお、定量に際しては、無水酢酸-硫酸(20:1, v/v)の混液4ml を加えて Liebermann-Burchard 反応<sup>14)</sup>を行い、90秒後に発色した溶液の吸光度を610nm にて測定した。また、中性脂質中のトリグリセリドの測定は、つぎの様にして行つた<sup>15)</sup>。すなわち、脂質抽出液の0.1~0.5ml をとり、イソプロピルアルコール3ml 加え吸着剤(Triglyceride-Test Wako)を1ml 加え激しく攪拌した後遠沈し上清1ml を試験管にとる。つぎに5%水酸化カリウム液2滴を加え37°C, 15分間加温しケン化する。2M 硫酸アンモニウム液1ml を加えさらに0.05M メタ過ヨウ素酸ナトリウム液0.1ml を加え混和し15分間室温においた後、2,4-ペンタジオン液2.0ml 加え37°C, 40分間加温し発色させる。流水にて冷却後410nm にて吸光度を測定した。

薄層クロマトグラフィー(以後 TLC と略す)によつて脂質抽出液中の非極性脂質と極性脂質を分離し、リン脂質および中性脂質の組成を同定した。すなわち、極性脂質であるリン脂質の TLC による同定は、20×20cm のガラスプレートを用いてシリカゲルGを蒸留水に懸濁

250 $\mu$ の様な厚さにしたTLC板を活性化(120°C, 10分)した後に用いた。このTLC板にリン脂質リンと約10 $\mu$ gをスポットして二次元展開を行った。一次展開溶媒としてクロロホルム-メタノール-7Nアンモニア水(90:54:11, v/v)を用い、二次展開溶媒としてクロロホルム-メタノール-酢酸-水(90:40:12:1, v/v)を用いた。展開後の各脂質の同定のためには、各種の呈色反応すなわち、ヨード発色<sup>10)</sup>、Dragendorff試薬<sup>10)</sup>およびcis-Aconitate試薬<sup>11)</sup>によるコリン含有脂質の発色、Dittmer試薬<sup>12)</sup>によるリン脂質の発色、ニンヒドリンによる遊離アミノ基の発色<sup>13)</sup>および $\alpha$ -ナフトール<sup>14)</sup>による糖含有脂質の発色を用いた。非極性脂質の同定にTLC板として5 $\times$ 20cmあるいは10 $\times$ 20cmを使用し、展開溶媒として石油エーテル-エーテル-酢酸(90:10:1あるいは70:30:1, v/v)を用いた。同定はそれぞれの標準物質とのR<sub>f</sub>値の比較によつて行つた。リン脂質の組成比は、展開されたTLC板を風乾した後に、50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>液を噴霧し150~160°Cにて20分間加熱し、それぞれのリン脂質に相当する黒色スポットを試験管に掻き取り、Rouserの方法<sup>15)</sup>に従つて測定した。

またステロール化合物のガスクロマトグラフィー(GLCに略す)による分析、およびリン脂質、トリグリセリドの脂肪酸鎖のGLC分析は、つぎの様に进行了。すなわち、ステロールについては、上述の $n$ -ヘキサン抽出液を減圧乾固し、市販のトリメチルシリル化剤であるTMS-HT(東京化成)を0.2ml加え封管し60°Cで2~3分間の加熱を行いTMS化を行う。冷却後、クロロホルムと水を等量加えよく混和し、3回水洗いしてからクロロホルム層を分け、濃縮してGLCの試料とした。GLCの条件は、カラムが3% OV-17, 2mガラスカラムで温度は230°Cである。キャリアガスは窒素ガスで流量は40ml/分とした。検出器は水素炎イオン化検出器(FID)を使用した。リン脂質および中性脂質の脂肪酸構成のGLCによる分析は、TLCによつて展開された各スポットをクロロホルムあるいはクロロホルム-メタノール混液(1:1, v/v)により抽出して得た脂質分画を濃縮乾固し、三フッ化ホウ素メタノール錯溶液を加え10~30分間沸騰水浴中で脂肪酸メチルエステルを得、冷却後 $n$ -ヘキサンによつてその脂肪酸メチルエステルを抽出、濃縮したものを試料とした。GLCの条件は、カラムが15% DEGS(ジエチレングリコールサクシネート)の2mステンレスカラム、カラム温度は185°Cであり、窒素ガスをキャリアガスとして用い流量は

35ml/分に調節した。さらに、TMS化されたステロールの同定<sup>16)</sup>のためには、GLCと質量分析計(MS)を直結したGC-MS(ガスクロマトグラフ質量分析計)を使用した。分析条件はLKB-9000(島津製)を使い1% OV-1の2mガラスカラムを用いた。ヘリウムガスをキャリアガスとして25ml/分の流速で分析した。また、イオン源温度は270°C、電子エネルギーは70eV、そして加速電圧は3500Vとしマススペクトル走査時間はm/e 520までを9秒とした。

#### 実験結果

菌の接種後2週間にわたり2日おきに菌体を採集した。*Epidermophyton floccosum*の場合には、図1に示されて

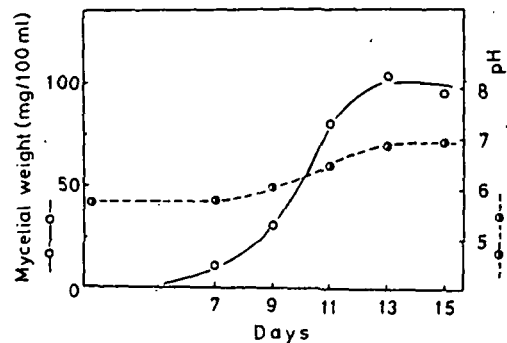


図1 *Epidermophyton floccosum* の発育曲線

いるように7日を経過してから対数増殖期に入り急速に増殖するのが観察された。一方、*T. rubrum*と*M. cookei*は*E. floccosum*に比べて発育が速く5日目には対数増殖期に入り、7日目ではすでに静止期に入ることが観察された。また、培地のpHの変化は、わずかずつではあるが上昇傾向が認められ、静止期では6.8に達する。

ところで、菌体の脂質含量はいずれの菌種においても4~5%であり、培養日数にかかわらずほぼ一定であつた。全脂質のTLCの分析の結果、非極性脂質にはトリグリセリド、ステロールおよび遊離脂肪酸とジグリセリドが含まれており、極性脂質には、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、カルジオリピン、グリコリピド、スフィンゴミエリン、ホスファチジルセリンが含まれ、また未知物質も含まれており、リンを含有しない新しい脂質であることが推測された。図2に各リン脂質のスポットおよび未同定脂質(X)、中性脂質(NL)を示す。

ところで、乾燥菌体1g当りから抽出されるリン脂質、トリグリセリド、ステロールの定量分析を行い、そ



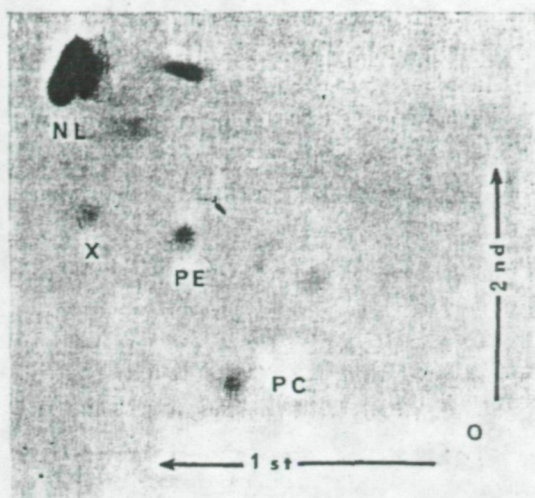


図2 *Epidermophyton floccosum* の総脂質の二次元展開薄層クロマトグラム  
 一次元展開:  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $7\text{N NH}_4\text{OH}$  (90:54:11, v/v)  
 二次元展開:  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $\text{CH}_3\text{COOH}$ :  $\text{H}_2\text{O}$  (90:40:12:2, v/v)  
 NL; 中性脂質, PC; ホスファチジルコリン, PE; ホスファチジルエタノールアミン, X; 未同定脂質, O: 原点

の結果をまとめたものが表1である。リン脂質量は培養日数が増すにつれて著しい減少を示した。ステロール含量は、最初に半減してその後はほぼ乾燥菌体1g 当り10  $\mu\text{mole}$  であつて変化が見られない。一方、トリグリセリドは逆に若干増加する傾向がある。ところで、リン脂質の構成比は、表2のように培養日数によつて大きな変化は認められないが、レシチンが33%、ホスファチジルエ

表1 *Epidermophyton floccosum* の発育に伴う脂質変化

脂 質	培 養 日 数	7	9	11	13(日)
トリグリセリド*		4.7	3.4	4.3	6.5
ステロール*		21.4	10.1	9.0	10.5
リン脂質*		54.1	19.4	16.1	10.3
ステロール/リン脂質 (モル比)		0.40	0.53	0.56	0.97

\*  $\mu\text{mole/g}$  (乾燥菌体)

表2 *Epidermophyton floccosum* のリン脂質構成の変化

リン脂質 (%)	培 養 日 数	7	9	11	13(日)
カルジオリビン		10.7	12.7	10.0	7.6
ホスファチジル エタノールアミン		41.8	37.2	41.3	45.2
ホスファチジルコリン		34.6	33.9	32.4	35.9
そ の 他*		12.9	17.2	17.3	11.3

\* ホスファチジルセリン, ホスファチジルイノシトール, スフィンゴミエリンなど

タノールアミンが41%, カルジオリビンが10%程度であつた。その他の成分はホスファチジルセリン, スフィンゴミエリンなどを含めて16%ほどである。

つぎに、菌体総脂質の脂肪酸を GLC によつて分析した結果は表3に示されているが、いずれにおいても  $\text{C}_{16:0}$  (パルミチン酸),  $\text{C}_{16:1}$  (パルミトオレイン酸),  $\text{C}_{18:0}$

表3 *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* と *Microsporum cookei* の発育に伴う菌体総脂質の脂肪酸構成の変化

脂 肪 酸	<i>Epidermophyton floccosum</i>					<i>Trichophyton rubrum</i>				<i>Microsporum cookei</i>			
	7	9	11	13	15(日)	3	5	7	10(日)	3	5	7	10(日)
$\text{C}_{16:0}$ (パルミチン酸)	17.0	16.9	16.5	18.6	17.5	17.7	14.6	18.8	13.1	17.0	18.8	18.3	23.6
$\text{C}_{16:1}\Delta^9$ (パルミトオレイン酸)	2.0	2.3	1.1	1.5	1.9	4.1	0.6	1.0	tr	2.5	1.8	2.5	4.2
$\text{C}_{18:0}$ (ステアリン酸)	6.4	6.1	5.9	7.4	7.5	2.0	1.4	3.1	6.8	0.9	2.9	4.7	6.8
$\text{C}_{18:1}\Delta^9$ (オレイン酸)	8.1	8.1	7.4	7.1	7.6	8.9	6.6	4.4	10.6	16.1	23.5	27.6	40.8
$\text{C}_{18:2}\Delta^{9,12}$ (リノール酸)	62.9	65.3	68.7	64.6	64.5	65.7	76.2	71.0	69.5	60.8	51.3	41.2	24.1
総不飽和脂肪酸/ 総飽和脂肪酸	3.1	3.3	3.5	2.8	3.0	4.0	5.6	3.5	4.0	4.4	3.5	3.1	2.3

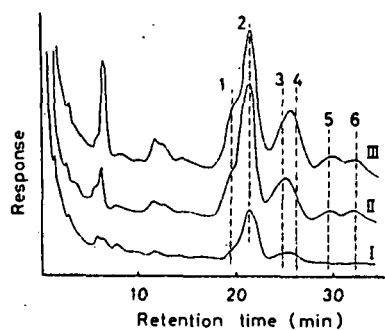
表4 *Epidermophyton floccosum* の発育に伴うリン脂質およびトリグリセリドの脂肪酸構成の変化

脂 肪 酸	リ ン 脂 質										トリグリセリド				
	ホスファチジルコリン					ホスファチジルエタノールアミン									
	7	9	11	13	15 (日)	7	9	11	13	15 (日)	7	9	11	13	15 (日)
$C_{18:0}$ (パルミチン酸)	14.9	11.5	11.3	12.5	15.0	23.0	16.8	12.6	17.5	17.0	17.6	16.1	15.3	15.5	16.3
$C_{18:1}d^9$ (パルミトオレイン酸)	3.2	tr	tr	tr	tr	3.1	tr	tr	tr	tr	2.9	1.3	0.5	tr	tr
$C_{18:0}$ (ステアリン酸)	5.3	5.7	6.1	5.0	5.4	6.4	6.4	3.1	2.7	3.1	8.3	9.1	8.9	7.9	8.5
$C_{18:1}d^9$ (オレイン酸)	13.8	13.2	11.2	12.0	8.1	10.0	7.7	5.8	6.8	4.7	10.2	12.2	12.2	11.6	10.6
$C_{18:2}d^{9,12}$ (リノール酸)	60.7	69.6	71.3	69.9	71.5	55.6	69.1	78.5	73.0	75.2	58.8	53.9	55.8	64.9	64.6
総不飽和脂肪酸/ 総飽和脂肪酸	4.3	4.5	4.7	4.7	3.9	2.3	3.3	5.4	4.0	4.0	2.8	2.7	2.8	3.3	3.0

tr; 0.4%以下の脂肪酸

(ステアリン酸),  $C_{18:1}$  (オレイン酸) と  $C_{18:2}$  (リノール酸) の5種類の脂肪酸から構成されており, 他の細胞系に比べてきわめて単純な組成である. *E. floccosum* と *T. rubrum* の脂肪酸構成の変化は *M. cookei* の場合と異なっていることが見られる. すなわち, *E. floccosum* においては,  $C_{18:0}$  が17~18%,  $C_{18:1}$  が1~2%,  $C_{18:2}$  は6~7%,  $C_{18:3}$  は7~8%,  $C_{18:4}$  は63~69%であり, 培養日数による変化は, 顕著ではなかった. *T. rubrum* においてもほぼ同様な構成変動を示す. この両者に対して *M. cookei* においては,  $C_{18:0}$  が17%から24%に増加しており,  $C_{18:1}$  は0.9%から6.8%に増加し,  $C_{18:2}$  についても16%から40.8%へと著しい増加を示している. それに反して,  $C_{18:3}$  は60.8%から24.1%に顕著に減少している.

*E. floccosum* の主なリン脂質のホスファチジルコリン, ホスファチジルエタノールアミンおよびトリグリセリドを TLC によつて分画したもののついて, それぞれの画分の脂肪酸組成を GLC によつて分析しその結果を表4に示した. すなわち, 培養日数によつてホスファチジルコリンの場合には  $C_{18:0}$  は11~15%,  $C_{18:1}$  は5~6%,  $C_{18:2}$  は11~13%,  $C_{18:3}$  は61~71%であり  $C_{18:4}$  の変動が大きい. つぎにホスファチジルエタノールアミンにおいても同様に  $C_{18:0}$  は13~23%,  $C_{18:1}$  は3~6%,  $C_{18:2}$  は5~10%,  $C_{18:3}$  は56~75%であり  $C_{18:4}$  の変動が大きい. 一方, トリグリセリドの場合は  $C_{18:0}$  が15~18%,  $C_{18:1}$  が8~9%,  $C_{18:2}$  が10~12%,  $C_{18:3}$  が59~65%であり, リン脂質と比較してトリグリセリドの変化は少ない.

図3 *Epidermophyton floccosum* のステロールのガスクロマトグラム

1:エルゴステラエノール, 2:エルゴステロール, 3:エルゴスタジエノール, 4:ラノステロール, 5:ジメチルスチグマスタジエノール, 6:メチルスチグマスタジエノール, I:7日, II:11日, III:13日培養

つぎに, ステロールの TMS 化物を GLC によつて分析した結果, 主成分のエルゴステロールの他に各種のステロールの存在が確かめられた. そこで, GC-MS による同定を Brooks らの方法<sup>21)</sup>によつて試みた. 図3に示されているように, ピーク2のエルゴステロールを中心に, ピーク1からピーク6までの各種のステロールの存在が見られ, それらの含有量も培養日数とともに変化していることが示されている. ピーク1からピーク6までの GC-MS の結果から, 主なフラグメントイオンを表5にまとめた. ピーク1は, 親イオン ( $M^+$ ) が466で4個の不飽和結合をもつた炭素数28のステロールであるこ



表5 TMS-ステロールのマススペクトルの  
フラグメントイオン

ピーク No.	分子イオン (M <sup>+</sup> )	おもなフラグメントイオン
1	466	451, 376, 337, 251, 129
2	468	378, 363, 337, 253, 131, 69
3	470	380, 365, 339, 253, 131
4	498	480, 393, 255, 241, 227, 187, 129
5	512	497, 407, 255, 241, 227
6	498	483, 408, 393, 255, 129

とを示している。特徴的なフラグメントイオンは  $m/e$  451, 376, 337, 251, および129である。したがって、ステロイド骨格内に3個の不飽和結合をもち側鎖に1個の不飽和結合をもつこと、また  $m/e$  240がないことから  $\Delta^{5,7,22}$ -ジエン誘導体とは考え難く、むしろ、このピーク1はエルゴスタ-5, 7, 14, 22-テトラエノールであろうと推定される。ピーク2は、親イオン (M<sup>+</sup>) が468で他のフラグメントイオンは  $m/e$  378, 363, 337, 253, 131そして69であり、炭素数28のステロールと考えられ、しかも2個の環内不飽和結合を有し、側鎖に1個の不飽和結合を有しており、Books らの報告<sup>21)</sup>と一致しており、エルゴステロール (エルゴスタ-5, 7, 22-トリエノール) と同定した。ピーク3は、親イオン (M<sup>+</sup>) が470で炭素数28のステロールであると考えられ、特徴的なフラグメントイオンは  $m/e$  380, 365, 339, 253そして131であつた。なお、このステロール構造はフラグメントイオンから推測すると、環内不飽和結合が2個であることから Blank らの報告<sup>2)</sup>にある *E. floccosum* のもつエルゴステロールと「ブラシカステロール (エルゴスタ-5, 22-ジエノール) とは異なつたエルゴスタ-5, 7-ジエ

ノールであると考えられる。ピーク4は、親イオン (M<sup>+</sup>) が498で炭素数30のステロールであり特徴的なフラグメントイオンは483, 393, 255, 241, 227, 187そして129でありラノステロール (lanosterol) と同定される。つぎに、ピーク5は親イオン (M<sup>+</sup>) が512で炭素数31のステロールと考えられ、そして特徴的なフラグメントイオン  $m/e$  497, 407, 255, 241, 227を有することから、環内に1個の不飽和結合と側鎖に1個の不飽和結合をもつステロールでスチグマステロール (stigmasterol) 誘導体と考え、ジメチルスチグマスタジエノールと推定した。このように同定されたステロールの変動を表6に示した。主成分であるエルゴステロールは、発育に伴い68%から51%へとかなりの減少を示しており、エルゴスタジエノール+ラノステロールが23%から28%に増加しており、スチグマステロール誘導体 (ピーク5, 6) は、初期対数期にはほとんど検出されていないが、対数増殖期を過ぎる11日目ごろから増加して6%ほどにまで達する。なお、ここに、*E. floccosum* で見出された各種ステロールの化学構造を図4に示す。

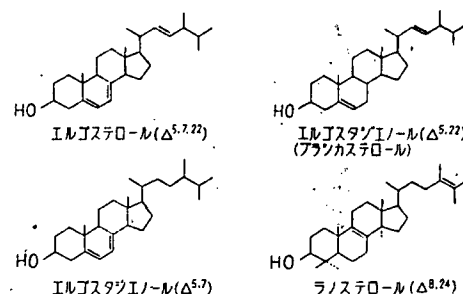


図4 検出された各種ステロールの化学構造

## 考 察

*E. floccosum*, *T. rubrum* および *M. cookei* の脂質構成

表6 *Epidermophyton floccosum* の発育に伴うステロール構成の変化

培 養 日 数	7	9	11	13	15 (日)
ス テ ロ ー ル					
1. エルゴスタテトラエノール	8.2	10.7	9.7	13.0	10.0
2. エルゴステロール	68.3	64.6	56.9	46.4	50.5
3. エルゴスタジエノール + 4. ラノステロール	22.6	21.2	25.4	29.5	28.2
5. ジメチルスチグマスタジエノール	tr	tr	2.8	5.0	5.9
6. メチルスチグマスタジエノール	0.8	3.6	5.4	5.9	5.7

定量分析を行った結果、総脂肪酸組成に関しては、菌糸状菌以外の真菌類と同じようにパルミチン酸 ( $C_{16:0}$ )、ステアリン酸 ( $C_{18:0}$ )、オレイン酸 ( $C_{18:1}$ )、リノール酸 ( $C_{18:2}$ ) の脂肪酸が主成分であり、ほぼ95%以上を占め、ラウリン酸 ( $C_{12:0}$ )、ミリスチン酸 ( $C_{14:0}$ ) は合わせて少ない。とくに、リノール酸が多く *E. floccosum* と *T. rubrum* において60%あるいはそれ以上も及んでいる。ところで、*T. rubrum* の脂肪酸については、Wirth ら<sup>9)</sup> が静置培養における脂肪酸組成を報告しているが、それによると  $C_{16:0}$  が23.8%、 $C_{18:0}$  が7.4%、 $C_{18:1}$  が13.1%、 $C_{18:2}$  が52.4%含まれており、むしろわれわれの *M. cookei* の脂肪酸構成に近い。ところで、Al-Doory ら<sup>4)</sup> が報告しているように *T. rubrum* の乾燥菌体当りの総脂質量は、振盪培養の場合には18.5%であるのに対して静置培養の場合には23.7%と増加するの、*E. floccosum* の振盪培養の場合には総脂質量が14.8%であるのに対して、静置培養では27.9%と増加するのである。このように、細胞発育条件の差に起因して脂質量が変化するものと考えられ、その結果脂肪酸組成の変動をもたらしているものと考えられる。*M. cookei* に関しては、発育段階による脂肪酸の組成変化が著しく、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$  が増加するのに対して  $C_{18:2}$  の著しい減少が見られた。

中性脂質に関しては、ステロール含量が、初期対数期には著しく減少し、その後はそのまま静止期に至るまで変化しないのに反して、トリグリセリドの含量の変化は、静止期に至つておよそ2倍に増加している。この点に関しては Al-Doory ら<sup>4)</sup> が報告しているように静置培養の場合のアセトン可溶脂質すなわち中性脂質画分の含量が著しく多く、われわれの結果とよく一致する。ステロール成分に関しては、従来の報告と異なつた知見が得られた。たとえば、Blank ら<sup>9)</sup> が報告しているように *E. floccosum* においては、エルゴステロールが主成分として含まれており、さらにブラシカステロール (45, 22-エルゴスタジエノール) が微量含まれているとされているが、われわれの分析結果によると、エルゴステロールの他にエルゴスタテトラエノール、エルゴスタジエノール、ラノステロール、さらにはスチグマスタジエノールが検出されている。また、培養日数によつてこれらのステロール成分の組成比が異なつており、エルゴステロールが減少し、エルゴスタジエノール+ラノステロールおよびスチグマスタジエノールが増加している。このエルゴスタジエノールは、Blank らの報告<sup>9)</sup> によると 45, 22-

エルゴスタジエノールとして同定されているが、われわれの GC-MS 分析の結果では 45, 7-エルゴスタジエノールであると考えられる。

リン脂質に関しては、初期対数増殖期において 54  $\mu\text{mole/g}$  菌体から 19  $\mu\text{mole/g}$  菌体に減少しており、その後も徐々に減少し続けることが示された。このことは、Das ら<sup>10)</sup> の *T. rubrum* についての報告とよく一致しており、リン脂質含量が初期対数期において 118  $\mu\text{g}$  から 60  $\mu\text{g}$  へと減少し、その後も減少している。彼等<sup>10)</sup> は、脂質合成の増加あるいは総脂質の減少に起因しているものと考えているが、細胞壁の形成が進むとともに多糖体の含量が増加するために相対的に脂質量が減少することになるものと著者らは考えている。*E. floccosum* のリン脂質の主成分は、ホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルコリンであり、培養日数による大きな組成変化はないものと考えられる。*T. rubrum* におけるリン脂質に関して、Das ら<sup>10)</sup> はホスファチジルセリンを主成分として、他にホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンを含むことを報告しており、また、ホスファチジルエタノールアミンが静止期に至つて減少し、ホスファチジン酸とホスファチジルイノシトールが増加することが示されている。このように、リン脂質の構成成分が異なっていることは、発育条件の差に起因しているものと考えられるが、今後の詳細な分析が必要とされる。さて、リン脂質の脂肪酸組成に関しては、Kish ら<sup>11)</sup> が *Arthroderma uncatum* における野生株と異型株との各リン脂質における脂肪酸鎖の組成比が異なつていないことを報告しているが、われわれは培養日数による各リン脂質の脂肪酸鎖の変化を観察した。その結果、ホスファチジルエタノールアミンにおいては、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸が減少しているが、リノール酸は逆に増加している。また、レシチンでは、パルミチン酸とステアリン酸の変動はないが、オレイン酸の減少とリノール酸の増加が見られた。ところで、リン脂質とステロールとのモル比を見ると 11 日目ごろまではほぼ 0.5 で一定しているが、13 日目には 1.0 となり脂質成分の含量が変動しており、リン脂質の脂肪酸鎖構成の変化とステロールの量的な変動とをあわせ考えると、細胞発育に伴つて細胞膜の化学組成ひいては物理化学的な変化が生じることが推測される。

おわりに、GC-MS の測定に御協力いただきました近畿大学理工学部の林陽教授、松浦史登助教授に感謝致します。



## 文 献

- 1) Cochlane, V.W.: The composition of fungus cells. In Physiology of fungi, p. 45—49, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1968.
- 2) Audette, R.C.S., Baxter, R.M. & Walker, G.C.: A study of the lipid content of *Trichophyton mentagrophytes*. Can. J. Microbiol., 7: 282—283, 1961.
- 3) Blank, F., Shortland, F.E. & Just, G.: The free sterols of dermatophytes. J. Invest. Dermat., 39: 91—94, 1962.
- 4) Al-Doory, F.: Quantitative studies of total lipids of pathogenic fungi. Appl. Microbiol., 10: 492—495, 1962.
- 5) Wirth, J.C. & Anand, S.R.: The fatty acids of *Trichophyton rubrum*. Can. J. Microbiol., 10: 23—27, 1964.
- 6) Ghoshal, J.: Phospholipids of *Trichophyton rubrum*. Sci. & Cult., 35: 694—695, 1969.
- 7) Domer, J.E. & Hamilton, J.G.: The readily extracted lipids of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. Biochim. Biophys. Acta, 231: 465—477, 1971.
- 8) Kish, Z. & Jack, R.C.: Phospholipids of two strains of dermatophytes, *Arthroderma uncatum*. Lipids, 9: 264—268, 1964.
- 9) Das, S.K. & Bannerjee, A.B.: Phospholipids of *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia, 12: 281—286, 1974.
- 10) Nozawa, Y., Kitajima, Y. & Ito, Y.: Chemical and ultrastructural studies of isolated cell walls of *Epidermophyton floccosum*. Biochim. Biophys. Acta, 307: 92—103, 1973.
- 11) Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H.S.: A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. J. Biol. Chem., 226: 497—509, 1957.
- 12) Rouser, G., Siakotos, A.N. & Fleischer, S.: Quantitative analysis of phospholipids by thin layer chromatography and phosphorous analysis of spots. Lipids, 1: 85—86, 1966.
- 13) Zurkowski, P.: A rapid method for cholesterol determination with a single reagent. Clin. Chem., 10: 451—453, 1964.
- 14) Fletcher, M.J.: A colorimetric method for estimating serum triglycerides. Clin. Chim. Acta, 22: 393—397, 1968.
- 15) Skidmore, W.D. & Entenman, C.: The determination of esterified fatty acids, triglycerides, cholesterol esters and phosphatides. J. Lipid Res., 3: 356—363, 1962.
- 16) Beiss, U.: Paper-chromatographic separation of plant lipids. J. Chromatog., 13: 104—110, 1964.
- 17) Vaskovsky, V.E. & Suppes, Z.S.: Detection of choline-containing lipids on thin-layer chromatograms. J. Chromatog., 63: 455, 1971.
- 18) Dittmer, J.C. & Lester, R.L.: A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. J. Lipid Res., 5: 126—127, 1964.
- 19) Skipski, V.P., Peterson, R.F. & Barclay, H.: Separation of phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine and other phospholipids by thin-layer chromatography. J. Lipid Res., 3: 467—470, 1962.
- 20) Siakotos, A.N. & Rouser, G.: Analytical separation of non-lipid water soluble substances and gangliosides from other lipids by dextran gel column chromatography. J. Am. Oil Chemists' Soc., 42: 913—919, 1965.
- 21) Brooks, C.J.W., Horning, E.C. & Young, J.S.: Characterization of sterols by gas-chromatography mass spectrometry of the trimethyl silyl ethers. Lipids, 3: 391—402, 1968.

## The Lipid Composition and Its Alteration during the Growth Stage in Pathogenic Fungus, *Epidermophyton floccosum*

Tomiyasu Yamada, Ryuji Watanabe, Yoshinori Nozawa and

Yuki Ito

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine, Tsukasamachi-40, Gifu

There are a few reports about the lipid metabolism of dermatophytes. In this communication, the qualitative and quantitative changes of lipid composition during the growth stages were studied principally with *Epidermophyton floccosum*. The acyl group composition of total lipids of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum cookei* were also examined. The lipids of *E. floccosum* amounted to approximately 4% of the dry cell weight. Neutral lipids consisted of mainly triglycerides and sterols, and major polar lipids were phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and an unusual lipid "X" which has not been identified yet. The fatty acids found in triglycerides and phospholipids were palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic acids. The unusual polar lipid "X" which appeared between phosphatidylethanolamine and cardiolipin on TLC plate was found to contain no phosphorus. The acyl group composition of this lipid "X" was markedly different from those of triglycerides, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine.

There was no significant changes in the fatty acid composition of *E. floccosum* and *T. rubrum* during the cell growth, while *M. cookei* revealed its profound changes. The sterol composition of *E. floccosum* showed striking, qualitative as well as quantitative changes depending on the growth stage.